

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

UNTERSUCHUNGEN ÜBER CLOSTRIDIUM-PERFRINGENS-INFEKTIONEN
BEI ZOOTIEREN UND ÜBER DIE MÖGLICHEN INFEKTIONSQUELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Habib Chenitir
Tierarzt aus Zaghouan/Tunesien
Berlin 1968
Journal-Nr.-635

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

UNTERSUCHUNGEN ÜBER CLOSTRIDIUM-PERFRINGENS-INFEKTIONEN
BEI ZOOTIEREN UND ÜBER DIE MÖGLICHEN INFEKTIONSQUELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Habib Chenitir
Tierarzt aus Zaghuan/Tunesien
Berlin 1968
Journal-Nr.-635

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Prof. Dr. G. Bergmann
Referent:	Prof. Dr. H. Hartwig
Korreferent:	Prof. Dr. H.-J. Sinell

Tag der Promotion: 5.7.1968



Meiner lieben Frau gewidmet!



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533915_0120

	Seite
A <u>Einleitung</u>	5
B <u>Literatur</u>	7
I Vorkommen und Verbreitung des Clostridium perfringens A	7
II Erkrankungen von Tieren durch Typ A des Clostridium perfringens	10
C <u>Eigene Untersuchungen</u>	17
I Material	17
a) Tierstämme	18
b) Erdstämme	20
c) Standardstämme	20
II Technik	21
a) Probeentnahme, Keimisolierung und Aufbewahrung der Stämme	21
b) biochemische Testungen	22
c) Herstellung toxinhaltiger Filtrate	23
d) Antiseren	24
III Stammdifferenzierungsmethoden	24
a) Prüfung der Toxine im Mäuseletalitätstest ohne Trypsinbehandlung	24
b) Prüfung der Toxine im Mäuseletalitätstest mit Trypsinbehandlung	25
c) Prüfung der Toxine im Neutralisationstest mit Typseren	26
d) Hitzeresistenzprüfung	27
e) Prüfung der unter Verwendung der Pope-Bouillon hergestellten Toxine im Mäuseletalitätstest	27
IV Ergebnisse	28
a) Ergebnisse der biochemischen Stammtestungen	28
b) Ergebnisse der Dlm-Ermittlung vor und nach Trypsinierung der Toxin- filtrate von den Erdstämmen, den Tierstämmen und dem Futtermittel- stamm	29
1. Erdstämme	29

2. Tierstämme und Futterstamm	30
c) Dlm der von der Oberfläche verschiedener Tiergehege und aus verschiedenen tiefen Erdschichten gewonnenen Cl. perfringens-Stämme	32
d) Ergebnisse der Neutralisation im Mäuseletalitätstest mit Typ A-Antiserum	34
e) Ergebnisse der Dlm-Ermittlung vor und nach Trypsinierung sowie der Neutralisation mit Typ A-Antiserum	35
f) Ergebnisse der Hitzeresistenzprüfungen unter Verwendung des Gehirnbreimediums nach HIBLER	37
g) Ergebnisse der Letalitätsteste an der Maus unter Verwendung der Pope-Bouillon bei 50 Erdstämmen	38
D <u>Besprechung</u>	40
E <u>Zusammenfassung</u>	44
F <u>Literaturverzeichnis</u>	45

A Einleitung =====

Bei Untersuchungen von Zoo-Tieren zur Ermittlung der Krankheits- oder Todesursache sind im Institut für Veterinär-Hygiene bei Paardehnen wiederholt Krankheitszustände festgestellt worden, die den Verdacht einer Gasödem-Infektion erweckten.

In den vom Institut für Veterinär-Pathologie übermittelten Organteilen waren in diesen Fällen Anaerobier nachweisbar, die als *Clostridium perfringens* (welchii) erkannt wurden. Die Frage des vorliegenden Types dieser Spezies blieb unbeantwortet, da die Voraussetzungen für eine Typendifferenzierung zu der Zeit, als die Untersuchungsmaterialien anfielen, fehlten.

Es war aber möglich, vier aus Zoo-Tieren isolierte Stämme lebensfähig zu erhalten und später auf den vorliegenden Typ zu untersuchen.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, die vier Kulturstämme mit dem von OAKLEY und Mitarbeitern (43) empfohlenen Verfahren des Neutralisationstestes zu differenzieren und gleichzeitig eine größere Zahl von Stämmen, die kurz nach den letzten Verlusten an Zoo-Tieren aus Erdproben verschiedener Auslaufgehege und Futterproben isoliert worden waren oder sich noch in eingetrocknetem Erdprobe-Material in Reagenzröhrchen befanden, auf den vorliegenden Typ zu untersuchen.

Bei Typengleichheit der in den Tierorganen, Erd- und Futterproben ermittelten *Perfringens*keime bestand die Hoffnung, den Ursprung der enzootisch im Zoologischen Garten auftretenden Krankheitsfälle aufzuklären.

Andererseits ließ sich die Frage nicht sicher beantworten, ob die vor längerer Zeit untersuchten vier Zoo-Tiere tatsächlich an einer *Perfringens*-Infektion gestorben waren. Denn die von der Schule von OAKLEY für den Nachweis einer solchen Infektion geforderten Tatbestände waren in einem Punkt nicht erfüllt.

Nach OAKLEY und Mitarbeitern (43) soll sich die Diagnose der Perfringens-Infektion auf folgende Feststellungen gründen:

- 1.) auf ein klinisches Bild, das den Verdacht der Perfringens-Infektion rechtfertigt
- 2.) auf pathologisch-anatomische Veränderungen, die ebenfalls für eine Perfringens-Infektion sprechen
- 3.) auf den Nachweis von Perfringens-Keimen in großer Zahl in den Organen und im Darmkanal
- 4.) auf den Nachweis von Perfringens-Toxinen in Auszügen von Organen und Darminhalt, wobei diejenigen Toxine vorliegen sollen, die für den ermittelten Erregertyp charakteristisch sind.

Die ersten drei Forderungen konnten bei den untersuchten Tieren als erfüllt angesehen werden. Aber es unterblieb der Toxinnachweis in den Organproben und im Darminhalt der toten Tiere, und es fehlte damit der letzte Beweis für das Vorliegen der Infektion.

Die routinemäßig durchgeführte diagnostische Untersuchung wird sich in der Regel auf den Toxinnachweis im Tier nicht erstrecken können, weil Infektionen durch *Cl. perfringens* bei Tieren in unserer geographischen Breite nur selten vorkommen und die Antiseren zum Nachweis der Toxine oft nicht zur Verfügung stehen. Es kommt hinzu, daß Arbeiten, die sich mit den serologischen Methoden des Toxinnachweises im Organmaterial toter Tiere beschäftigen, mir nicht zugänglich waren.

B Literatur

=====

I) Vorkommen und Verbreitung des Clostridium Perfringens A

Das Cl. perfringens ist ein grampositives, plumpes, anaerobes Stäbchen und im Gegensatz zu den anderen Clostridienarten unbeweglich. Im Tierkörper ist es bekapselt, Sporen soll es nur im kohlehydratfreien Nährboden bilden (74). Es vermehrt sich in Leberbouillon unter stärkerer Gasentwicklung. Schon nach drei Stunden entstehen Toxine.

Auf Blutagar entwickeln sich knopfartige, erdbeerfarbige und bei Einwirkung von Sauerstoff oder Luft grün werdende Kolonien mit schmutzig-braunem hämolytischem Hof (74).

Nach den Wirkungen der Toxine werden neben dem klassischen Gasbrandbacillus Cl. perfringens (Typus A) noch Cl. agni (Typus B), Cl. paludis (Typus C), Cl. ovitoxicus (Typus D), Cl. vitulitoxicus (Typus E) und Cl. enterotoxicus (Typus F) unterschieden.

Eine begrenzte Standortgebundenheit der einzelnen Typen wird angenommen, aber der für den Menschen spezifisch betrachtete Typ A kommt auch bei Tieren vor, sodaß bei den vorliegenden Typen wohl mit einem breiteren Infektionsspektrum gerechnet werden muß.

Das Cl. perfringens A ist ein ubiquitärer Anaerobier, dessen Ansprüche an ein anaerobes Milieu nicht sehr groß sind. Im Vergleich zu den anderen Typen wird es besonders häufig im Erdboden, im Staub, im Wasser und im Darminhalt von Menschen und Tieren gefunden, so daß es zu den am weitesten verbreiteten Anaerobiern gehören dürfte. Es liegen keinerlei Anhaltspunkte dafür vor, daß die geographische Verbreitung des Keimes auf bestimmte Gegenden beschränkt ist (17).

Systematische bakteriologische Untersuchungen von 193 Erdproben auf den europäischen Kriegsschauplätzen ergaben 1919 in jedem Falle Cl. perfringens Typ A (74).

TAYLOR und GORDON (66) isolierten 1940 aus Ackererde 196 Stämme des "Bacillus welchii", davon gehörten 189 zu dem Typ A.

SASAKI (54) untersuchte in Mitteljapan 160 Erdproben von Gräbern, Spielplätzen, Straßen, Hauswänden usw. und stellte in jeder Probe den Typ A des Cl. perfringens fest.

Nach KRANEWELD und DJAENOEDIN (zit. nach 74) enthielten 50 Erd- und Staubproben von Sport- und Spielplätzen in Java ohne Ausnahme den Typ A.

PRÉVOT (45) wies nach, daß auch in Erdproben tropischer und äquatorialer Gegenden Afrikas und Amerikas sowie der Arktis und Antarktis der Typ A enthalten war.

Untersuchungen des Bodens der nordafrikanischen Wüste ergaben in 26 Proben kultivierter Erdflächen 22 Stämme Cl. perfringens Typ A und in 41 Proben unkultivierter Flächen nur einen Stamm des gleichen Types (30).

In Erdproben Norditaliens wurde von MONDOLFO (zit. nach 74) ebenfalls der Typ A des Cl. perfringens nachgewiesen.

Von TOMOV (68) und Mitarbeitern wurden 33 Cl. perfringens A-Stämme aus Erdproben von Schafweiden isoliert.

ALTEMEIER (2) hat 1944 immer Typ A festgestellt, wenn er Straßenstaub untersuchte.

Nach GEERS (zit. nach 74) enthält gepreßter und getrockneter Schlamm von städtischen Abwässern reichliche Mengen von Cl. perfringens-A-Keimen.

AMBROSIONI (3) untersuchte Wasserproben aus Gegenden, in denen die Kanalisation gegen den Zutritt von Schmutz und Fremdwasser nicht absolut gesichert war. Er fand dabei den Typ A des Cl. perfringens.

PRÉVOT (46) isolierte 1957 aus 22 Schlammproben 8 A-Stämme.

SMITH und GARDNER (61) konnten zeigen, daß in gewöhnlichen Erdproben und Schlamm eine Vermehrung des *Cl. perfringens* Typ A eintreten kann, da mehr vegetative Formen als Sporen vorlagen.

Bei der Mehrzahl der *Perfringens*-Stämme, die bei der Untersuchung von Erdproben aus dem Garten des Rudolf-Virchow-Krankenhauses in Berlin durch EFFKEMANN (zit. nach 74) isoliert worden waren, handelte es sich um Typ A.

AKAMA und Mitarbeiter (1) wiesen den Typ A auch im Darminhalt von Menschen nach.

Die meisten Stämme, die SIDORENKO (59) aus Stuhlproben von gesunden Menschen isolierte, gehörten dem Typ A an.

SHINJO (58) fand im Kot und Darminhalt von verschiedenen Tierarten, insbesondere von Leoparden, Tigern, Schweinen, Katzen und Kaninchen, den Typ A von *Cl. perfringens*.

TOBESCH (67) konnte ebenfalls im Kot von Schafen in einzelnen Fällen den Typ A feststellen.

Das gleiche gilt für ARDEHALI (4), der den Darminhalt von verschiedenen Tieren untersuchte.

MC BEE (33) berichtete kürzlich, daß er im Darminhalt von Raubvögeln der Antarktis oft Anaerobier-Stämme, und zwar am häufigsten des *Cl. perfringens* Typ A, fand.

Über das Vorkommen von *Cl. perfringens*-Infektionen der Typen B bis E bei Tieren sind in der Literatur zahlreiche Mitteilungen enthalten, so daß eine erschöpfende Darstellung im Rahmen dieser Arbeit unmöglich ist. Es sei deshalb auf zwei umfassende Arbeiten der neueren Zeit von STAMATIN und UNGUREANU (63) sowie von ARDAHALI (4) hingewiesen.

STAMATIN und UNGUREANU (63) stellten fest, daß die Typen

A und D des Cl. perfringens häufig, die Typen B, C und E dagegen nur selten in der Erde vorkommen.

II) Erkrankungen von Tieren durch Typ A des Clostridium perfringens

Die Tatsache, daß der Typ A des Cl. perfringens sich besonders oft im Erdboden befindet, erklärt, daß dieser Typ als Ursachen des Gasgangräs beim Menschen nach Verwundungen hauptsächlich in Betracht kommt (56).

GINNS und KOEPPEN (15) stellten beispielsweise fast bei jedem Gasbrandfall des Menschen den Typ A fest.

In einer englischen Statistik von 1945 veröffentlichten COOKE, PEENEY und THOMAS (9), daß bei 2680 Kriegerverwundeten 76 Gasödeme beobachtet wurden. In 48 Fällen wurde der Typ A ermittelt.

Bei 33 Gasödemem des Menschen haben MAC FARLANE und MAC LENNAN (29) 26 mal Typ A isoliert.

ZEIBLER (74) und PREVOT (47) geben weiterhin umfassende Darstellungen über die Bedeutung dieses Types für den Menschen.

Über das Vorkommen von Cl. perfringens Typ A als Erreger des Gasbrands bei Tieren wird in der Literatur ebenfalls berichtet.

WAGNER (70) wies 1923 in der Muskulatur eines Ochsens Cl. perfringens Typ A als alleinigen Erreger eine Fränkelinfection nach.

MIEBNER und ALBRECHT (38) beschrieben 1924 bei einem Pferd eine durch Typ A verursachte Gasbrandinfection.

Nach DALLING (zit.nach 52) wurden Todesfälle bei Kühen nach der Geburt infolge "Geburtsrauschbrand" beobachtet, die durch den Typ A hervorgerufen worden waren.

REINBERG, FORGÉOT und LOUREU (zit.nach 47) beschrieben 1937 ein Gasbrandödem des Euters bei Schafen, das durch den Typ A verursacht worden war.

Über eine Erkrankung des Hundes durch Cl. perfringens Typ A berichtete PRITCHETT (49) 1942.

1961 stellten PRÉVOT-JACOTOT und VALLÉE (48) bei Maultieren Gasbrandfälle fest, die durch den Typ A verursacht worden waren.

OTTEN und HENZE (44) konnten bei Hunden Erkrankungen an Tonsillitis auf eine Infektion mit dem Typ A des Cl. perfringens zurückführen.

WEYMOUTH (72) glaubte den Typ A bei kranken Kapaunen gefunden zu haben.

Nach MAC LENNAN (31) hat der Typ A auch als Lebensmittelvergifter Bedeutung.

STRONG (65) untersuchte zahlreiche Lebensmittelproben, sie enthielten ohne Ausnahme den Typ A des Cl. perfringens.

Nach HALL und ANGELOTTI (19) wurden in 262 Proben von Fleisch und Fleischprodukten 113 mal Cl. perfringens-Stämme gefunden. Eine Angabe des Types fehlte.

DISCHE und ELEK (13) bewiesen experimentell am Menschen, daß Typ A ein Lebensmittelvergifter ist.

Mehrere Fälle von Lebensmittelvergiftungen durch Cl. perfringens beschreiben HOBBS und Mitarbeiter (24) und ARLAN und Mitarbeiter (5).

SINELL und LEVETZOW (60) gelang ein quantitativer Nachweis von Cl. perfringens bei Lebensmittelintoxicationen. Um welchen Typ es sich in diesem Fall handelte, war nicht bekannt.

HOBBS (23) schreibt dem Typ A als Lebensmittelvergifter eine hohe Hitzeresistenz zu.

HAUSSCHILD und THATCHER (21) führten Untersuchungen über die Hitzeresistenz von Perfringenskeimen durch, die Lebensmittelvergiftungen hervorgerufen hatten. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß die Hitzeresistenz gering ist.

In Nordfrankreich wurden 120 Vergiftungen in einer Betriebskantine beobachtet, deren Ursache mit dem Typ A infiziertes Rindfleisch war (41).

Der Typ A des Cl. perfringens wird auch als Ursache von Enterotoxämien bei verschiedenen Tierarten erwähnt.

1936 berichteten LESBOURYIES und BERTHELON (27) über eine durch Typ A verursachte Enterotoxämie der Kaninchen.

Die gleichen Autoren (zit. nach 47) beobachteten 1937 Enterotoxämiefälle bei Ziegen und Kälbern, die durch Cl. perfringens Typ A hervorgerufen worden waren.

ROSE und EDGAR (zit. nach 51) machen den Typ A für die Entstehung ikterischer Enterotoxämien bei Rindern und Schafen verantwortlich.

Bei Schafen und Lämmern beobachtete COTTEREAU (10) eine schwere Erkrankung an Enterotoxämie infolge Infektion mit dem Typ A. Die Infektion war anscheinend durch das Futter erfolgt, in dem der Typ A in großer Zahl ermittelt wurde.

1952 isolierte MINETT (zit. nach 26) vier Stämme, die eine Enterotoxämie und eine ikterische Hämoglobinurie bei Schafen verursacht hatten. Alle vier Stämme gehörten dem Typ A an.

1954 wurden von QUINN (50) in Kalifornien durch Typ A hervorgerufene Enterotoxämiefälle bei Schafen beschrieben.

Enterotoxämien bei Schafen infolge einer Infektion mit dem Typ A wurden von MAC GOWEN, MOULTON und ROOD (35) festgestellt.

Ebenso wies SCHOFIELD (57) in Kanada eine durch Typ A verursachte Enterotoxämie beim Rind und SCHIRLEY (55) bei Kälbern nach.

Erkrankungen von Rindern und Büffeln an Enterotoxämien durch Typ A wurden in Bulgarien beobachtet (25).

Über eine Infektion des Darmes beim Hund durch Cl. perfringens Typ A berichteten BOULAY und BOULEY (7) sowie WEIPERS (71).

NOUVEL und RINJARD (zit. nach 47) stellten bei vier See-Elefanten eine Enterotoxämie fest, die durch Cl. perfringens Typ A verursacht war.

PRÉVOT und Mitarbeiter (48) beschrieben je einen Fall von Enterotoxämie infolge einer Infektion mit dem Typ A bei Nerzen und einer Brieftaube.

Dieselben Autoren machten den Typ A für eine tödliche Enterotoxämie bei einem Pinguin verantwortlich (48).

CYGAN und WĄZRHIEWICZOWA (11) teilten im Jahre 1966 Beobachtungen über eine Infektion des Magen-Darm-Kanals bei verschiedenen Tierarten durch Cl. perfringens Typ A mit. Um welche Tierarten es sich handelt, wurde nicht erwähnt.

Das Krankheitsbild der Perfringensinfektion ist nicht einheitlich und hängt im wesentlichen von der Eintrittspforte des Erregers und der Art seiner Toxine ab, die zur Wirkung kommen. Es wird die Auffassung vertreten, daß innere oder äußere Faktoren die Pathogenität des Erregers steigern können. Daß der auch bei gesunden Tieren im Darm vorkommende Keim unter Umständen plötzlich schwere Schädigungen hervorrufen kann, wird mit der Art der Fütterung und der verabfolgten Futterstoffe in ursächlichen Zusammenhang gebracht.

Inwieweit der funktionelle Zustand des Magen-Darm-Kanals dabei noch eine Rolle spielt, ist zwar Gegenstand von Untersuchungen gewesen (11, 16, 36), aber nicht in befriedigender Weise klargestellt worden.

Bei einer Funktionsstörung des Verdauungsapparates, wie z.B. bei der Neutralisation des Trypsins durch den Colostralfaktor bei 10 Tage alten Lämmern oder bei einer plötzlichen Futterumstellung (8) überschreiten Vermehrung der Keime und Toxinproduktion die Toleranzgrenzen des Körpers, so daß es zu einer Erkrankung kommt.

Die klinischen Erscheinungen bestehen in Futterverweigerung, Abgeschlagenheit, Schläfrigkeit und taumelndem Gang (6). Die Tiere liegen viel, achten nicht auf ihre Umgebung, zeigen Schmerzempfindlichkeit in der Leibgegend und schließlich Durchfall (17).

Nicht in allen Fällen treten Krankheitserscheinungen hervor. Oft verenden die Tiere über Nacht oder in kürzester Frist am Tag, ohne vorher Anzeichen einer Krankheit gezeigt zu haben (40).

Das klinische Krankheitsbild wird durch die Art der pathologisch-anatomischen Befunde bestimmt.

Bei der Untersuchung der Tiere, die an einer Typ A - Enterotoxämie verenden, kommen diffuse Rötungen des Dünndarms, peritoneale, epi- und endokardiale Petechien vor. Die Leber ist vergrößert, brüchig und blaß; die Nieren sind geschwollen, weich und rötlich-braun. Die Blase ist mit dunkelrotem, klarem Urin gefüllt. Die Lungen sind dunkelrot, feucht und oedematös (35, 48).

Bei Tieren, die an einer durch Typ B verursachten Enterotoxämie erkrankt waren, liegt oft eine hochgradige Abomaso-enteritis vor.

Weitere Hinweise auf eine B-Enterotoxämie geben eine hochgradige Duodenitis, Jejunitis und Ileitis. Im Dünndarm, mitunter aber auch im Dickdarm, können Anzeichen

einer hämorrhagischen, ulzerierenden Enteritis vorhanden sein. Die Geschwüre sind rund und unregelmäßig begrenzt. Die Darmschleimhaut kann dabei stark geschwollen und tiefrot gefärbt sein.

Bei der Mehrzahl der B-Fälle liegen Lungenödeme, subepikardiale petechiale Blutungen und starke Blutstauungen in Leber und Niere vor (6,35).

Die Veränderungen, die bei Typ C-Infektionen erwachsener Schafe beobachtet werden, bestehen in Enteritiden, Abomasitiden und Ulzerationen im Dünndarm sowie Transsudation in die Bauchhöhle. Im Herzbeutel befindet sich oft ein bernsteingelbes Exsudat, in der Kranzfurche können am Epikard Blutungen festgestellt werden (17,34,62).

Die Sektionsbefunde an Tieren, die an einer Enterotoxämie durch Cl. perfringens Typ D gestorben sind, sind durch eine starke, oft breiige Erweichung der Nieren gekennzeichnet. Deshalb wurde dieses Leiden auch "Pulpy Kidney Disease" (Breinierenkrankheit) genannt.

In der linken Herzkammer findet man oft zahlreiche subendokardiale Blutungen.

Herzbeutel- und Bauchhöhlenflüssigkeit sind vermehrt. Typisch für die D- Enterotoxämie sind die leere Beschaffenheit des Dünndarms und die Verdickung der Wand der kaudalen Darmabschnitte (39,53).

Aus diesen kurzen Befundbeschreibungen ist zu ersehen, daß weder klinisch noch pathologisch-anatomisch Möglichkeiten gegeben sind, die durch die verschiedenen Typen des Cl. perfringens bedingten Krankheitszustände bei den verschiedenen Tierarten zu unterscheiden. Hieraus folgt, daß nur die bakteriologische Differenzierung, die sich auf den Nachweis bestimmter von den einzelnen Typen gebildeter Toxine bezieht, eine Aussage über die Art der vorliegenden Perfringensinfektion zuläßt.

Bei der Behandlung der durch die sechs Typen des Cl. perfringens hervorgerufenen Erkrankungen versucht man die

im Blut zirkulierenden Toxine durch Serotherapie zu neutralisieren. Außerdem werden chemotherapeutische Maßnahmen wie insbesondere eine Applikation von Antibiotika durchgeführt.

1940 konnte STEPHENSON (64) in vergleichenden Studien zeigen, daß die Serotherapie sehr wirksam gegen toxinogene Stämme ist, daß hingegen die Sulfonamidtherapie gegen virulente und schwach toxische Stämme einen Effekt hat.

Behandlungsversuche an Mäusen, die durch *Cl. perfringens* experimentell infiziert waren, hatten folgende Ergebnisse: Bei Sulfadiazin blieben 93,8%, bei Sulfathiazol 83% und bei Sulfanilamid 27,2% der Mäuse am Leben. Bei Anwendung der Serotherapie überlebten 100% der Mäuse die Infektion (18).

NAGLER (45) wies 1945 experimentell die Notwendigkeit einer kombinierten Therapie nach, wobei Antibiotika und eine Serotherapie angewendet wurden.

MORAILLON und YALCIN (41) prüften die Empfindlichkeit der aus Futtermitteln isolierten *Cl. perfringens* A-Stämme gegenüber Antibiotika und Sulfonamiden und stellten dabei fest, daß in Frankreich isolierte Stämme resistent gegenüber Tetrazyklin, Oxytetrazyklin, Streptomycin und Furadoin waren.

Dagegen zeigten Stämme, die in Ländern isoliert waren, in denen ein Antibiotikazusatz zu Futtermitteln nicht üblich war, allen Antibiotika und Sulfonamiden gegenüber eine ausreichende Empfindlichkeit.

C Eigene Untersuchungen

=====

I Material

Am 30.8.1966 und am 30.1.1967 wurden im Berliner Zoologischen Garten zwei tödlich verlaufende, durch *Cl. perfringens* verursachte Enterotoxämien bei einer Girafenzelle (*Litocranius walleri*) und einer Säbelantilope (*Oryx tao*) festgestellt.

Da sich in früherer Zeit derartige Fälle auch bei anderen Paarhufern schon ereignet hatten, bestand ein Interesse daran, einerseits den Erregertyp zu ermitteln, andererseits durch Umgebungsuntersuchungen abzuklären, ob und wo bestimmte Infektionsquellen für die Tiere vorhanden waren.

Ich richtete bei diesen Umgebungsuntersuchungen mein besonderes Augenmerk auf die von den Tieren seit Jahren benutzten Auslaufgehege und entnahm von den verschiedensten Stellen und aus verschiedenen Tiefen Erdproben, um diese auf das Vorkommen von *Cl. perfringens* zu prüfen. Dabei kam es darauf an zu klären, ob die Erregertypen bei den Tieren und in den Erdproben übereinstimmten. Außerdem wurden Futterproben auf das Vorhandensein von *Cl. perfringens* untersucht. Weiterhin wurden auch Erdproben von Nachbargehegen, in denen keine Enterotoxämien aufgetreten waren, und von Flächen eines öffentlichen Parkes, die mit Sträuchern bepflanzt waren, also nicht von Tieren benutzt wurden, auf *Cl. perfringens* untersucht, um zwischen Erdproben mit und ohne Tierhaltung vergleichen zu können.

Von der üblichen Meinung ausgehend, daß die clostridialen Infektionen der Tiere sich im wesentlichen von Clostridien, die in den Humusschichten der Erde vorkommen, herleiten, wurde erwartet, daß insbesondere derjenige Typ des *Cl. perfringens*, der am häufigsten in der Erde vorkommt und möglicherweise Infektionen bei Zootieren verursacht, ermittelt werden konnte.

Aus zwei weiteren, wahrscheinlich an inneren Verletzungen verendeten Tieren des Zoologischen Gartens, einer Giraffengazelle (*Litocranius walleri*) und einer Kuduantilope (*Tragelathus strepsiceros*) konnte gleichfalls Cl. perfringens isoliert werden. Auch diese Keime sollten typisiert und mit den typisierten Erdstämmen der Gehege der Tiere und anderer Gehege verglichen werden.

a) Tierstämme

1) Der Stamm 1048 wurde aus einer etwa 3 Jahre alten weiblichen Giraffengazelle (*Litocranius walleri*) isoliert. Am 30.8.1966 zeigte dieses Tier Gleichgewichtsstörungen, am folgenden Tage wurden unkoordinierte Bewegungen und Streckkrämpfe beobachtet. Die Gazelle kam zum Festliegen und verendete am nächsten Tag.

Bei der Sektion des Tieres wurden folgende Veränderungen festgestellt: Hirnödem mit Blutungen in die Leptomeninx; katarrhalisch-hämorrhagische Duodenitis; petechiale Blutungen in der Labmagenschleimhaut und unter den serösen Häuten; pulpös-hyperplastische Milzschwellung; Hämaturie durch Erythrozytendiapedese in die Bowman'schen Kapselräume der Nieren.

2) Der Stamm 158 wurde aus einem alten, am 30.1.1967 verendeten Säbelantilopenbock (*Oryx tao*) isoliert. Das Tier hatte seit einigen Tagen nur noch wenig Futter aufgenommen.

Durch die pathologisch-anatomische Untersuchung wurden ausgedehnte Blutungen in Unterhaut, Muskulatur, intermuskulärem und peritrachealem Bindegewebe des Kopfes und des Halses, petechiale Blutungen unter dem Epikard, Endokard und unter der Magen-Darm-Serosa, eine katarrhalische Abomasitis und Duodenitis sowie Schaumnieren festgestellt.

Der Nachweis von *Cl. perfringens* gelang in den Lungen, der Leber, den Nieren, in verschiedenen Darmabschnitten, Darmbeinlymphknoten und in der Skelettmuskulatur.

3) Der Stamm 342 wurde aus einem am 3.3.1967 verendeten Giraffengazellenbock (*Litocranius walleri*) isoliert. Das Tier zeigte Apathie und vermochte zwei Tage vor seinem Tod nicht mehr aufzustehen. Eine Behandlung mit Chloromycetin und anderen Antibiotika blieb ohne Erfolg.

Bei der Obduktion wurden folgende Befunde erhoben: Gelenkkapselriß des rechten und Kapselriß mit Luxation des linken Hüftgelenkes; frische Hämatome in der rechten und linken Oberschenkelmuskulatur, an der Halsunterseite und an der Brustwand; akute fibrinöse Pleuritis; Lungenödem; flächenhafte subepikardiale und subendokardiale Blutungen.

Bakteriologisch konnte neben Staphylokokken und vergrünen Streptokokken *Cl. perfringens* in der Leber, in den Nieren, in der Milz und im Darm ermittelt werden.

4) Der Stamm 172 wurde aus einer am 3.2.1967 verendeten 11/2-jährigen, weiblichen Kuduantilope (*Tragelaphus strepsiceros*) isoliert. Dieses Tier wurde am 31.1.1967 eingefangen und in eine Transportkiste gebracht. Dabei zog es sich wahrscheinlich beim Anrennen an ein Gitter innere Verletzungen zu. Fünf Stunden später legte sich das Tier nieder und vermochte nicht mehr aufzustehen.

Bei der Sektion wurden Hautabschürfungen über den Jochbögen, über Ellenbogen- und Kniegelenken sowie Hüftböckern festgestellt. An den Extremitäten sowie am Hals waren Unterhaut und Fascien blutig-ödematös durchtränkt. Die Muskulatur in diesen Bereichen zeigte ein beginnendes Gasödem. Weiterhin wurden petechiale und flächenhafte Blutungen unter Epikard, Endokard, Pleura und Darmserosa nachgewiesen.

b) Erdstämme

1) 75 Erdproben wurden aus folgenden Gehegen entnommen:

Säbelantilopen-Gehege	(SA)
Schwarzschnauzkänguruh-Gehege	(SSK)
Grantgazellen-Gehege	(GG)
Große Kuduantilopen-Gehege	(KA)
Giraffengazellen-Gehege	(G)
Renntier-Gehege	(R)

Aus allen 75 Erdproben wurde Cl. perfringens isoliert. Für die Stammbezeichnungen wurden fortlaufende Zahlen mit den in Klammern befindlichen Anfangsbuchstaben der Gehege, die vor die Zahlen gesetzt wurden, benutzt.

Die Stämme SA 3, GG 16,1, GG 44, GG 46, GG 47 und G 75 wurden aus einer Bodentiefe von 10 - 20 cm, die Stämme SSK 9 und G 45 aus einer Bodentiefe von 40 - 50 cm isoliert.

2) In 10 Erdproben eines öffentlichen Parkes wurde ebenfalls in jedem Fall Cl. perfringens festgestellt. Die Stämme wurden mit dem Buchstaben P 1-10 bezeichnet.

¹⁰
Bei Untersuchungen von Futterproben, die an die Tiere verabfolgt worden waren, gelang es nur aus einer Weizenprobe Cl. perfringens zu isolieren. Dieser Stamm erhielt die Bezeichnung WZ 90.

c) Standardstämme

Um die isolierten Stämme in ihren Eigenschaften mit bekannten Stämmen vergleichen zu können, wurden folgende typisierte Standardstämme des Institutes vom Wellcome-Research-Laboratorium Beckenham (England) verwendet:

A₁ (CN 3.920), B₁ (CN 684), D₁ (CN 3.683).

Außerdem wurden die Stämme A₂ (3.624), B₂ (3.626) der amerikanischen Typkultursammlung, Rocheville (Maryland) zu Vergleichszwecken benutzt.

Der Vergleichsstamm D₂ war dem Institut im Jahre 1963 von Herrn Prof. Dr. Mitscherlich, Göttingen, zur Verfügung gestellt worden.

Alle Vergleichsstämme wurden schon zu früheren Untersuchungen (14, 22, 32, 67 und 69) verwendet und sollten insbesondere als Vergleichsgrundlage bei den Neutralisationstesten dienen.

II. Technik

a) Probeentnahme, Keimisolierung und Aufbewahrung der Stämme

Die Erdproben wurden mit sterilen Reagenzröhrchen entnommen und in diesen aufbewahrt. Soweit die Proben aus tieferen Erdschichten entnommen wurden, wurde der Erdprobenentnehmer nach GERSON verwendet.

Zur Keimisolierung wurden 0,5 g der Erdprobe in Reagenzröhrchen mit Le-Le-Bouillon gegeben. Das Nährsubstrat wurde vor der Beimpfung durch Kochen erhitzt und dann in Schräglage abgekühlt, wobei der Vaselinering an der Glaswand verfestigte, so daß die Beimpfung mühelos erfolgen konnte. Nach Beimpfung wurde die Vaseline durch Erwärmung des Röhrchens von der Seite zwecks Erreichung eines luftdichten Abschlusses wieder verflüssigt. Die Bebrütung bei 37,5°C wurde auf 6 - 8 Stunden nach luftdichtem Verschuß mit Vaseline bemessen. Da Cl. perfringens sich in der Bouillon schnell vermehrte, konnte nach dieser Zeit bereits eine Trübung und eine Gasentwicklung beobachtet werden.

1-2 Ösen der Bouillonkultur wurden auf eine Traubenzuckerblutagarplatte ausgestrichen und unter Verwendung der Bierfilzmethode mit Pyrogallol-Pottasche (K_2CO_3) 16 Stunden bei 37°C anaerob bebrütet.

Wiederholt gelang es, durch dieses einfache Vorgehen Reinkulturen zu gewinnen. Von der Primärkultur wurde generell eine mittelgroße Cl. perfringens-Kolonie abgestochen, auf eine Le-Le-Bouillon überimpft und sechs Stunden bebrütet. Von der Bouillon wurde dann abermals auf eine Traubenzuckerblutagarplatte beimpft und von dieser eine

Einzelkolonie abgestochen und auf eine Le-Le-Bouillon überimpft und nochmals 6 Stunden bebrütet. Von dieser Kultur wurde ein Le-Le-Bouillonröhrchen beimpft, um diese Kultur nach 6-stündiger Bebrütung bei -20°C zu lagern. Das zur Einsaat verwendete Kulturröhrchen wurde bei Kühlschranktemperaturen ($+5^{\circ}\text{C}$) vorrätig gehalten.

Es kam gelegentlich vor, daß auf der ersten Traubenzucker-Blutagarplatte Kolonien verschiedener Keime gewachsen waren. In diesen Fällen wurde eine Cl. perfringens-verdächtige Kolonie abgestochen und in gleicher Weise wie vorher beschrieben bis zur Erlangung einer Reinkultur weitergeimpft.

Nicht immer konnten die Erdproben unmittelbar nach der Entnahme kulturell auf Cl. perfringens untersucht werden. 25 Erdproben wurden in Reagenzröhrchen 5 - 6 Monate bei Zimmertemperatur ($+25^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt, so daß die Proben bei Vornahme des Kulturversuches vollständig ausgetrocknet waren. Trotzdem gelang die Isolierung des Cl. perfringens ohne Schwierigkeiten. Allerdings dauerte in diesen Fällen die Anzüchtung in Le-Le-Bouillon bis zur Entstehung der gewünschten Trübung 12 - 16 Stunden.

b) Biochemische Testungen

Diese beschränkten sich auf die Prüfung der Fermentierung von Glukose, Maltose, Laktose und Saccharose, Gelatine-Verflüssigung, Indolbildung und Milchagarverdauung.

Für die Vergärungsproben wurde kohlehydratfreies Bakto-Thioglykolat- OXOID verwendet, dem in einer Menge von 1% der Zucker zugegeben worden war. Als Indikator wurden wenige Tropfen einer 0,4%igen wäßrigen Bromkresolpurpur-Lösung nach 1 - 2tägiger Bebrütung hinzugegeben.

Für die Prüfung auf Gelatinase-Aktivität wurde ein Thioglykolat-Dextrose-Gelatinesubstrat nach REED und ORR (zit. nach 20) in Reagenzröhrchen verwendet, das mit reichlicher Menge (2 Normalösen) einer 16-stündigen

Traubenzucker-Blutagarplatten-Kultur bis in die Röhrchenkuppe beimpft wurde. Nach 1 - 2tägiger Bebrütung bei + 37°C wurden die Gelatine-Röhrchen 1/2 Stunde bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt, um sie auf Verflüssigung des Nährmediums zu prüfen.

War nach dem Kühlschrankaufenthalt eine Verfestigung der Gelatine eingetreten, wurde der Stamm als gelatinase - negativ angesehen. Im Falle des Flüssigbleibens wurde der Stamm als gelatinase-positiv beurteilt.

Für die Prüfung auf Indolbildung diente das Reagenz nach KOVÁČS. Als Nährmedium wurde Thioglykolat, dem 1% Bakto-Trypton zugegeben worden war, verwendet. Die Bebrütungs-dauer betrug 2 Tage.

Zur Prüfung auf Milchagarverdauung wurde nach WILLIS (73) ein 1,25 %iger Nähragar, der 5% eines Fildes-Extraktes und 25% einer entrahmten und sterilisierten Milch enthielt, verwendet. Bei starker proteolytischer Fähigkeit kam es zu einer aufgehellten Zone um die Kolonie.

Alle Stämme wurden auf Eigelb-Agarplatten zum Nachweis der Lecithinasebildung überimpft. Das Substrat bestand aus einer Eigelblösung, die durch Mischung von gleichen Teilen Eigelb und physiologischer NaCl-Lösung (etwa je 20 ml) in einer Schüttelflasche unter Schütteln mit Glasperlen (5 Min.) hergestellt worden war. Die Eigelblösung wurde zu 10% einem verflüssigten und auf 55°C abgekühlten Nähragar zugegeben. Bei Lecithinasebildung zeigte sich um die gewachsenen Kolonien ein opaker Hof. Einige lipolytisch wirkende Stämme bilden nach WILLIS (73) einen perlmuttähnlichen, schimmernden Glanz auf den Kolonien. Bei Beurteilung der Opalascenz wurde auf diese Erscheinung geachtet.

c) Herstellung toxinhaltiger Filtrate

Für die Toxinproduktion wurde eine Caseinhydrolysat-

Dextrin-Bouillon nach LOGAN (28) und eine Trypsinverdauungsbrühe nach POPE (HALLMANN(20), verwendet.

Beide Nährböden wurden zu ca. 12 ml in Reagenzröhrchen gegeben und bis zum Gebrauch unter Vaseline-Verschuß aufbewahrt.

d) Antiseren

Mit den verschiedenen Typstämmen wurde versucht, für die Neutralisationsteste brauchbare Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen herzustellen. Dabei wurden Formoltoxide benutzt und wiederholte i.v.-Injektionen zwecks Hyperimmunisierung appliziert; alle auf diese Art hergestellten Antiseren reichten in ihrer Wertigkeit für den Neutralisationstest nicht aus.

Die Versuche zur Gewinnung hochwertiger Antiseren wurden fortgesetzt.

Durch Kontaktaufnahme mit einem irakischen Kollegen war es inzwischen möglich, in den Besitz eines A-Antiserums zu gelangen, das über ein Schaf durch Toxin-Injektionen hergestellt worden war und sich bereits in zahlreichen Versuchen bei der Differenzierung des Types A bewährt hatte.

III. Stammdifferenzierungsmethoden

a) Prüfung der Toxine im Mäuseletalitätstest ohne Trypsinbehandlung

Zur Prüfung der Toxine wurden 6-stündige Kulturen mit der Caseinhydrolysat-Dextrin-Bouillon hergestellt. Nach SEITZ-Filtration (E.K.-Filter-Größe 3) wurden die Filtrate entweder sofort den Letalitätstesten unterzogen oder im tiefgefrorenem Zustand aufbewahrt.

Für alle Letalitätsteste wurden institutseigene konventionell aufgezogene 18 - 20 g schwere NMRI-Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet. Die Zucht wurde im Jahre 1961 mit Tieren der Versuchstierzucht Hannover-Linden begonnen. Sie war frei von Ektromelie, Salmonellose, Virusdiarrhoe und anderen Erkrankungen. Lediglich traten bei über 2 Jahre alten weiblichen Mäusen bei etwa 10% der Tiere Mammatumoren auf. Gefüttert wurde das Standardfutter ALTROMIN, getränkt wurde mit Wasser ad libitum in Flaschen. Die Ermittlung der Dosis letalis minima (Dlm) vollzog sich bei den Kulturfiltraten in folgender Weise: von jedem Stamm wurden zunächst 0,2; 0,1; , 0,05 und 0,01 ml an je 2 Mäuse i.v. verimpft. Die geimpfte tödlich wirkende Menge wurde nicht als endgültig angesehen. Vielmehr wurde ein zweiter Versuch angesetzt, um den Zwischenwert zu ermitteln. Durch diese Art des Vorgehens war es möglich, die Dlm zuverlässig festzustellen.

Es galt stets diejenige Filtratmenge als Dlm, die innerhalb von 24 Stunden zwei 18-20 g schwere Mäuse tötete. Starb nur eine Maus, wurde der Versuch wiederholt. Starb wiederum nur eine Maus, wurde die nächsthöhere Dosis als Dlm angesehen. Zur Injektion wurde die Maus in ein Holzprobenröhrchen-Transportkästchen, das mit einer Zwinge an einer Tischkante befestigt war, in der Weise gebracht, daß der Schwanz nach Fixation des Endes mit 2 Fingern in einen am unteren Deckelrand ausgesparten Schlitz eingelegt und nach Deckelverschluß möglichst weit herausgezogen wurde. Nach kurzem Abreiben mit einem in Alkohol getränkten Zellstoffbausch wurde die Injektion in eine der deutlich hervorgetretenen Schwanzvenen mit einer 1 ml-Spritze und der Kanüle Cro-ni 0,25 x 19 mm ausgeführt. Als größte Injektionsmenge wurden 0,5 ml verwendet.

b) Prüfung der Toxine im Mäuseletalitätstest mit Trypsinbehandlung

Zwecks Prüfung auf Protoxine wurden alle Stammfiltrate einer Trypsinierung unterzogen. Dabei wurden 1-2 g % Trypsin (MERCK 2000 E/g) zu den Filtraten gegeben.

Nach 1/2stündigem Aufenthalt im Wasserbad bei 37°C blieben die Filtrate 1/4 Stunde bei Zimmertemperatur stehen.

Die Ermittlung der Dlm vollzog sich in gleicher Weise wie vorher beschrieben.

c) Prüfung der Toxine im Neutralisationstest mit Typseren

Beim Neutralisationstest wurden die Toxine mit den Antisera im Verhältnis 1:1 in sterilen Agglutinationsröhrchen vermischt. Zur Kontrolle wurde in einem weiteren Röhrchen anstelle des Antiserums zu dem Filtrat die gleiche Menge steriler physiologischer NaCl-Lösung gegeben. Da das hauptsächlich verwendete A-Antiserum durch Immunisierung eines Schafes hergestellt worden war, hätte als Kontrollserum vielleicht besser ein normales Schafserum Verwendung finden sollen. Jedoch wurde auf ein Schafserum verzichtet, zumal nach Untersuchungen von TOBESCH (67) gesunde Schafe u.U. auch Träger von Cl. perfringens im Darm sein können und nicht feststand, inwieweit ein normales Schafserum Antikörper gegen Cl. perfringens enthalten konnte.

Die Röhrchen mit Toxin-Antitoxin-Mischungen wurden in gleicher Weise wie die Kontrollröhrchen 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank belassen.

An je 2 Mäuse wurde eine mindestens 2 Letaldosen enthaltende Toxinmenge der 2 Röhrchen in Mischung mit Antiserum oder mit NaCl verimpft, wobei die Gesamtmenge von 0,5 ml je Maus als Inokulum nicht überschritten wurde.

Der Neutralisationstest wurde als positiv bewertet, wenn das Antiserum die doppelte Dlm des Toxinfiltrates bei beiden Mäusen neutralisierte, aber beide mit einem Gemisch von Toxin und physiologischer NaCl gespritzten Kontrolltiere innerhalb von 24 Stunden verendeten. Starb nur eine Kontrollmaus, so wurde der Test solange wiederholt, bis beide Kontrolltiere innerhalb 24 Stunden tot

aufgefunden wurden. Dieses Vorgehen wurde bei den insgesamt an 5000 Mäusen durchgeführten Testen als richtig erkannt, da es trotz zuverlässiger Bestimmung der Dlm vor- kam, daß die doppelte Dlm im Neutralisationsversuch bei den Kontrollmäusen nicht letal wirkte. In solchen Fällen handelt es sich meist um eine nicht lege artis erfolgte i.v. Injektion.

d) Hitzeresistenzprüfung

Da bei der Unterscheidung der Typen A bis E gegenüber dem Typ F dem Hitzeresistenztest eine gewisse Bedeutung beigemessen wird (74), wurden an allen 90 Stämmen Hitzeresistenzprüfungen nach der Methodik von DIECKMANN (12) durchgeführt.

Dabei wurden die aus Le-Le-Bouillon beimpften Gehirnbreiröhrchen 2 Tage bei 37°C bebrütet und 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um sie einer Erhitzung im Kochschen Dampftopf 5, 60 und 120 Minuten lang bei 100°C zu unterziehen.

Nach Erhitzung wurden die Röhrchen abgekühlt und 0,5 ml des Kulturmediums auf Le-Le-Bouillon überimpft. Es schloß sich eine 2-tägige Bebrütung bei 37°C an. Etwa 40 Stämme der Hirnbreikulturen wurden im Nativpräparat auf Sporen mittels Rakettefärbung untersucht, ohne daß Sporen gefunden wurden.

e) Prüfung der unter Verwendung der Pope-Bouillon hergestellten Toxine im Mäuseletalitätstest

Um die Abhängigkeit der Toxinbildung von der Art des verwendeten Nährmediums und der Dauer der Bebrütung zu prüfen, wurden Toxinfiltrate in der Weise wie TZIMAS es unternommen hat mit Pope-Bouillon hergestellt.

Hinsichtlich der Technik kann auf die Arbeit von TZIMAS (69) verwiesen werden.

IV Ergebnisse

=====

a) Ergebnisse der biochemischen Stammtestungen

Cl. perfringens ist durch seine runden, resedagrünen Kolonien und die meist doppelzonigen, an der Luft schmutzigrün werdenden Haemolysehöfe auf Traubenzucker-Blutagar-Platten sowie durch seine Unbeweglichkeit, das Fehlen von Sporen und seinen biochemischen Leistungen gekennzeichnet.

Alle isolierten Stämme zeigten auf Traubenzucker-Blutagar-Platten das typische Wachstum mit der charakteristischen Haemolyse. Kein Stamm war beweglich und zeigte in Leif-Bouillon-Kulturen Sporenbildung.

Alle 90 Stämme vergärten Glukose, Maltose und Laktose; Saccharose wurde von drei Stämmen nicht vergoren. 12 Stämme waren nicht in der Lage, Gelatine zu verflüssigen, während die Gelatineverflüssigung bei den übrigen 78 Stämmen gut ausgeprägt war. Auf Milchagar-Platten zeigten sich in Gegensatz zu den Angaben von WILLIS (73) bei allen Stämmen schwache Aufhellungshöfe. Demnach konnte bei allen Stämmen eine geringe proteolytische Aktivität nachgewiesen werden, während nach WILLIS bei *Cl. perfringens* auf Milchagar-Platten keine Aufhellungshöfe auftreten sollen.

Indol wurde von keinem der 90 Stämme gebildet. Auf Eigelb-Agarplatten zeigten alle Stämme um die Kolonien deutliche, durch das α -Toxin hervorgerufene opaleszierende Höfe. Eine perlmutterähnliche, die Kolonien überziehende Schicht, die bei Clostridien mit lipolytischen Fähigkeiten vorkommen soll, wurde niemals beobachtet.

Nach diesen Testungen kann mit großer Sicherheit das Vorliegen der Species *Cl. perfringens* bei allen 90 Stämmen angenommen werden.

b) Ergebnisse der Dlm-Ermittlung vor und nach Trypsinierung der Toxinfiltrate von den Erdstämmen, den Tierstämmen und dem Futtermittelstamm

1) Erdstämme

Von dem unterschiedlich lange bei -19°C gelagerten Toxinfiltraten der 85 Erdstämme wurde die Dlm ermittelt. In nachfolgender Tabelle 1 sind die Dlm-Werte in Letalitätsbereichen erfaßt und in Beziehung zur Lagerungsdauer gesetzt worden.

Tabelle 1: Letalität der Erdstämme in Beziehung zur Lagerungsdauer (in Tagen)

Dlm (in ml)	Zahl der Stämme	Dauer der Lagerung in Tagen	
		8-30 Tage	31-52 Tage
0,02 - 0,04	28	17	11
0,05 - 0,07	37	18	19
0,08 - 0,1	8	3	5
0,11 - 0,15	6	3	3
0,16 - 0,25	6	2	4
zusammen	85	43	42

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, zeigten die Toxinfiltrate der 85 Erdstämme eine unterschiedliche letale Wirkung. 28 Stämme entfielen auf den Letalitätsbereich von 0,02 - 0,04 ml, während 37 Stämme eine Dlm von 0,05 - 0,07 ml besaßen. Die restlichen 20 Stämme verteilten sich auf den Bereich von 0,08 - 0,25 ml.

Demnach zeichneten sich etwa 75% der Stämme durch eine hohe Toxizität aus, dagegen waren die übrigen Stämme weniger toxisch

Eine Beziehung zwischen Toxizität und Lagerungsdauer ließ sich nicht feststellen, da die über 30 Tage gelagerten Toxinfiltrate gleichhohe Letalitätswerte zeigten wie die nur bis zu 30 Tagen tiefgefrorenen Toxinfiltrate.

Zur Prüfung auf Protoxine wurden alle Toxinfiltrate einer Trypsinierung mit 1 - 2 g % Trypsin unterzogen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt die Tabelle 2.

Tabelle 2: Verhalten der 85 Erdstämme nach der Trypsinierung (ca 1-2 g %)

Abnahme der Dlm in ml	Zahl der Stämme
keine	48
0,01 - 0,05	30
über 0,05	7

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Toxinfiltrate von 48 Stämmen nach der Trypsinierung in ihrer Letalität unverändert bleiben. Bei 30 Stämmen verringerte sich die Dlm um 0,01 - 0,05 ml, während bei 7 Stämmen die Letalitätsminderung über 0,05 ml lag. Eine Erhöhung der Dlm nach Trypsinierung trat in keinem Fall ein, so daß das Vorhandensein von Protoxinen in den Filtraten ausgeschlossen werden konnte.

2. Tierstämme und Futterstamm

Die Ergebnisse der Letalitätsteste vor und nach Trypsinierung der Toxinfiltrate der Tier- und des Futtermittelstammes zeigt die umseitige Tabelle 3.

Tabelle 3 umseitig

Tabelle 3: Ergebnisse der Dlm-Ermittlung vor und nach Trypsinierung bei Toxinfiltraten der Tier- und des Futtermittelstammes

Stamm	Dlm vor Trypsinierung	Dlm nach Trypsinierung	Aktiviert durch Trypsin	Zeit der Lagerung in Tagen
158	0,05	0,05	--	23
342	0,06	0,06	--	23
172	0,12	0,19	--	23
1048	0,05	0,05	--	23
Wz90	0,06	0,07	--	--

Das Toxinfiltrat des Stammes 1048, der aus einer am 31.8.66 unter Streckkrämpfen verendeten weiblichen Giraffengazelle (*Litocranius walleri*) isoliert worden war, und das Toxinfiltrat des Stammes 158, der aus einem am 30.1.67 verendeten Säbelantilopenbock (*Oryx tao*) gezüchtet worden war, hatten eine Dlm von 0,05 ml.

Die Dlm des Toxinfiltrates des Stammes 172, der aus einer am 3.2.1967 an inneren Verletzungen erlegenen Kuduantilope (*Tragelathus strepsiceros*) isoliert werden konnte, betrug 0,12 ml.

Eine geringe Toxizität von 0,06 ml zeigte das Filtrat des Stammes 342, der aus einem an inneren Verletzungen gestorbenen Giraffengazellenbock (*Litocranius walleri*) gezüchtet werden konnte.

Der aus Weizen isolierte Futtermittelstamm hatte eine Dlm von 0,06 ml.

Bei allen 5 Stämmen blieb die Dlm nach Trypsinierung gleich oder sie verringerte sich geringgradig. Demnach lagen auch bei diesen Stämmen Protoxine in den Filtraten nicht vor.

c) Dlm der von der Oberfläche verschiedener Tiergehege und aus verschiedenen tiefen Erdschichten gewonnenen Cl. perfringens-Stämme.

In der Tabelle 4 sind die Fundorte der Erdstämme in den verschiedenen Tiergehegen in Beziehung zu den durchschnittlichen, maximalen und minimalen Dlm-Werten der betreffenden Gehege gesetzt. Die Erdproben wurden aus den oberflächlichen Erdschichten entnommen. Aus Vergleichsgründen sind in der letzten Querspalte 10 Cl.perfringensstämme ausgetestet, die aus Erdproben eines öffentlichen Parkes isoliert wurden.

Tabelle 4: Dlm der Erdstämme in ihrer Beziehung zu den Fundorten

Ort	Zahl der isolierten Stämme	Durchschnittliche Dlm	Dlm(in ml)	
			max. Wert	min.Wert
Säbelantilopengehege ②	10	0,05	0,02	0,14
Schwarzschnauzen-Känguruhgehege	6	0,07	0,02	0,25
Grantgazellengehege	4	0,05	0,04	0,06
Kuduantilopengehege ②	14	0,08	0,03	0,2
Giraffengazellengehege ②	22	0,07	0,03	0,24
Rehntiergehege	9	0,07	0,03	0,12
Park	10	0,08	0,05	0,16

② Gehege, in denen Tiere gehalten wurden, aus denen Cl. perfringens isoliert wurde.

Die durchschnittliche kleinste Letaldosis liegt zwischen 0,05 und 0,08 ml und gibt keinen Hinweis dafür, daß in Gehegen, in denen Tiere gehalten wurden, aus denen Perfringensstämme isoliert werden konnten, besonders toxische Erdstämme enthalten waren. Die stärkste letale Wirkung wurde mit 0,02 ml bei Stämmen des Säbelantilopen (*Oryx tao*)- und Schwarzschnanzkänguruh (*Wallabia bicolor*)- Geheges ermittelt. Es folgen mit 0,03 ml das Kuduantilopen (*Tragelathus strepsiceros*)-, Giraffengazellen (*Litocranius walleri*)- und Renntier (*Rangiser tarandus*)- Gehege. Bei Stämmen des Grantgazellen (*Gazella granti*)- Geheges wurden als geringste Dlm 0,04 ml und bei denen des Parkes 0,05 ml ermittelt.

Die Ergebnisse der Letalitätsteste der aus tieferen Erdschichten isolierten Perfringensstämme sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Die Dlm von 10 Cl. perfringens-Stämmen aus verschiedenen Erdschichten

Ort	Stamm	Tiefe cm	Dlm vor Trypsi- nierung	Dlm nach Trypsi- nierung	Zeit der Lagerung in Tagen
Säbelantilopen- gehege ●	SA 1	10-20	0,02	0,04	46
	SA 3	10-20	0,06	0,06	31
Schwarzschnanz- känguruhgehege	SSK 8	10-20	0,05	0,09	30
	SSK 9	40-50	0,2	0,25	8
Grantgazellen- gehege	GG16,1	10-20	0,07	0,07	48
	GG16,2	10-20	0,03	0,03	43
Giraffengazel- lengehege ●	G 44	10-20	0,04	0,06	37
	G 45	40-50	0,04	0,08	17
	G 46	10-20	0,11	0,15	34
	G 47	10-20	0,08	0,12	37

● Gehege, in denen Tiere gehalten wurden, an denen Cl. perfringens isoliert wurde

Es ist ersichtlich, daß aus den Gehegen der Säbelantilopen, der Schwarzschnauzkanarienvogels, der Grantgazellen und der Giraffengazellen in einer Tiefe von 10-20 cm und 40-50 cm Cl. perfringens gefunden werden konnte. Der Letalitätsbereich dieser Stämme unterscheidet sich nicht von dem der oberflächlich isolierten Stämme (s. Tabelle 4).

d) Ergebnisse der Neutralisation im Mäuseletalitätstest mit Typ A-Antiserum

Die Tatsache, daß es sich bei Erdstämmen aufgrund der Literatur in der Mehrzahl der Fälle um Cl. perfringens Typ A handeln soll, veranlaßte mich, zur Ermittlung der Typen Neutralisationsteste (NT) mit Typ A-Antiserum durchzuführen.

Das Typ A-Antiserum neutralisiert zunächst nur die Toxinfiltrate des Types A, vermag hingegen die letale Wirkung der Toxinfiltrate der Stämme B bis E nicht aufzuheben.

Das Mischungsverhältnis Serum-Toxinfiltrate betrug stets 1:1. Diese Mischung wurde an je 2 Mäuse in einer Menge verimpft, die 2 Dlm entsprach. Lag die Dlm bei 0,2 oder 0,25 des Toxinfiltrats, konnte nur 1 Dlm im NT verimpft werden, da als maximale Menge den Mäusen mehr als 0,5 ml nicht zugemutet wurde.

Die Ergebnisse der NT mit Typ A-Antiserum sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Ergebnisse der Neutralisation im Mäuse-
letalitätstest mit Typ A-Antiserum und
den Toxinfiltraten von 90 isolierten Stämmen.

Dlm (in ml)	Zahl der Stämme	Menge des verimpften Serum-Toxin- filtrat (in ml)	Ergebnis der Neutralisa- tion	Kontroll- mäuse
0,02 - 0,04	28	0,08 - 0,16	28 Mäuse überleben	gestorben
0,05 - 0,07	41	0,2 - 0,28	41 Mäuse überleben	gestorben
0,08 - 0,1	8	0,32- 0,4	8 Mäuse überleben	gestorben
0,11 - 0,15	7	0,5	7 Mäuse überleben	gestorben
0,16 - 0,25	6	0,5	6 Mäuse überleben	gestorben

Es war möglich, die letale Wirkung der Toxinfiltrate aller 90 Stämme mit Typ A-Antiserum zu neutralisieren, so daß alle Stämme als Cl. perfringens Typ A erkannt wurden.

e) Ergebnisse der Dlm-Ermittlung vor und nach Trypsinierung sowie der Neutralisation mit Typ A - Serum bei Toxinfiltraten der Standardstämme A bis D

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Neutralisationsteste wurden von institutseigenen typisierten Standardstämmen 6-stündige Toxinfiltrate hergestellt und nach Ermittlung der Dlm einer Trypsinierung und Neutralisation mit

Typ A-Antiserum unterzogen. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 7.

Tabelle 7: Ergebnisse der Dlm-Ermittlung vor und nach Trypsinierung sowie der Neutralisation mit Typ A-Antiserum bei Toxinfiltraten der Standardstämme A bis D

Stamm	Dlm ohne Trypsin	Dlm mit Trypsin	Neutralisation mit Typ A-Antiserum
A ₁	0,08	0,09 (-)	+
A ₂	0,07	0,08 (-)	+
B ₁	0,004	0,03 (-)	-
B ₂	0,002	0,01 (-)	-
D ₁	0,05	0,002 (+)	-
D ₂	0,01	0,002 (+)	-

Es ist ersichtlich, daß das Typ A-Antiserum nur die Toxinfiltrate der Typ A-Stämme zu neutralisieren vermochte, während die der Typen B und D in ihrer letalen Wirkung durch das Typ A-Antiserum nicht beeinflußt wurden.

Nach Trypsinierung wurde die Dlm bei den Toxinfiltraten der Typ A-Stämme gering, und die bei den Toxinfiltraten der Typ B-Stämme erheblich gemindert (-). Dagegen erhöhte (+) sich die letale Wirkung bei den Typ D-Stämmen um das 20-25 fache durch Umwandlung des Protoxins in Epsilontoxin.

f) Ergebnisse der Hitzeresistenzprüfungen unter
Verwendung des Gehirnbreimediums nach HIBLER

Nach ZEISSLER (74) gilt als Kriterium für Typ F-Stämme die Fähigkeit, in wenige Tage alten Gehirnbreikulturen mit Sicherheit Sporen auszubilden. Diese Sporen besitzen im Gegensatz zu den Sporen der übrigen Typen eine stark ausgeprägte Hitzeresistenz. Während die Sporen der Typen A-E selten einer 10-minütigen Erhitzung auf 100°C widerstehen, bleiben die Sporen des Types F nach einer 1-4 - stündigen Erhitzung bei 100°C lebensfähig.

Um den Typ F zu erkennen, wurden mit mehreren Tage alten Gehirnbreikulturen nach HIBLER (zit. nach 20) Hitzeresistenztests nach der Methode von DIECKMANN an allen 90 Stämmen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Prüfungen zeigt die Tabelle 8.

Tabelle 8: Ergebnisse der Hitzeresistenzprüfungen unter
Verwendung des Gehirnbreimediums nach
HIBLER

Dauer der Erhitzung	5 Minuten	60 Minuten	120 Minuten
Zahl der überlebenden Stämme	64	0	0
Zahl der abgestorbenen Stämme	26	90	90

Es ist ersichtlich, daß von 90 geprüften Stämmen 64 einer 5-minütigen Erhitzung bei 100°C widerstanden, während nach einer 1- und 2-stündigen Erhitzung bei 100°C alle 90 Stämme abgestorben waren.

Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß eine Hitzeresistenz bei allen 90 Stämmen nicht vorgelegen hat und demnach der Typ F ausgeschlossen werden konnte.

g) Ergebnisse der Letalitätsteste an der Maus unter Verwendung der Pope-Bouillon bei 50 Erdstämmen

TZIMAS (69) hat mit Toxinfiltraten typisierter Cl. welchii-Stämme unter Verwendung der Pope-Bouillon und 16-stündiger Bebrütung Letalitätsteste an der Maus durchgeführt. Nach seinen Ergebnissen waren die Typen B und D stark toxisch, während die Typen E und F eine geringere Toxizität zeigten und die Toxinfiltrate der Typen A und C eine Letalität nicht bewirkten. Die kleinste letalwirkende Dosis betrug bei den von TZIMAS verwendeten B- und D-Stämmen 0,02 ml und bei den E- und F-Stämmen 0,1 ml.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden unter Verwendung der Pope-Bouillon 16-stündige Kulturfiltrate von 50 Erdstämmen hergestellt und bestimmte Toxinmengen an jeweils 3 Mäuse verimpft.

Die Letalitätsverteilung der 50 Stämme ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Anzahl der unter Verwendung der Pope-Bouillon letalwirkenden Toxinfiltrate von insgesamt 50 als A-Typen differenzierten Erdstämmen

Zahl der Stämme	Letalitätsbereich in ml
6	0,1 - 0,2
2	0,2 - 0,3
6	0,3 - 0,4
36	keine Letalität

Mit 14 von 50 geprüften Toxinfiltraten der als A-Typen diagnostizierten Erdstämme war es möglich, bei der Maus nach i.v. Injektion eine Letalität hervorzurufen. 28% der Stämme erwiesen sich somit im Mäusetest als toxisch.

wobei die Dlm von 0,1 - 0,4 ml schwankte.

Die im Vergleich zu der Dlm aus Toxinfiltraten, die mit Logan-Substrat und nach 6-stündiger Bebrütungszeit der 90 Stämme hergestellt worden waren, weit geringere Dlm bei Popebouillon und 16-stündiger Bebrütung, läßt darauf schließen, daß Nährbodenart und Bebrütungszeit von ausschlaggebender Bedeutung für die Wirksamkeit der Toxine sind.

D Besprechung

Die biochemische Prüfung von 85 Erdstämmen, 4 Tierstämmen und einem Weizenprobenstamm ergab im wesentlichen die in der Literatur für *Cl. perfringens* charakteristischen Merkmale. Lediglich drei Stämme vergoren nicht Saccharose, entsprachen daher nicht den von WILLIS (13) für *Cl. perfringens* angegebenen biochemischen Merkmalen. Ebenso erfüllten zwölf Stämme die Eigenschaft der Gelatinasebildung nicht.

Bis auf einen gelatinase-negativen Tierstamm handelte es sich bei den drei saccharose-negativen und den elf gelatinase-negativen Stämmen um Erdstämmen.

Nach WILLIS soll *Cl. perfringens* auf Milchagar-Platten keine proteolytischen Eigenschaften zeigen. Die auf Milchagar-überimpften 90 Stämme ließen nach 24- und 48stündiger Bebrütung schwache Aufhellungshöfe um die Kolonien erkennen.

Es ist fraglich, ob diese schwachen Aufhellungshöfe im Sinne einer Proteolyse zu deuten waren.

Wesentlich waren für die Differenzierung die Morphologie der Kolonien, die Art der Hämolyse, die Unbeweglichkeit der Keime und ihre Vermehrung unter anaeroben Bedingungen.

Alle Stämme wiesen auf Eigelb-Platten das für den Typ A und auch die anderen Typen von *Cl. perfringens* charakteristische Phänomen der Opaleszenz auf.

Die Prüfung von Toxinfiltraten, die mit dem Logan-Substrat bei einer Bebrütungszeit von sechs Stunden hergestellt worden waren, auf ihre Toxizität ergab im Mäuseletalitätstest geringe Unterschiede in der Dlm, wobei die Erdstämmen im Vergleich zu den aus den Zootieren isolierten Stämmen und dem Futtermittelstamm überwiegend etwas toxischer waren. Jedoch waren die Unterschiede in der

Toxizität nicht so groß, daß man auf eine stärkere Toxizität der Erdstämme schlechthin schließen kann.

Eine Trypsinbehandlung der Toxinfiltrate der 90 Stämme bewirkte keine Erhöhung der Dlm. Diese Tatsache zeigt eindeutig, daß Protoxine in den Filtraten nicht enthalten waren. Oft blieb die Dlm bei Toxinfiltraten mit und ohne Trypsinbehandlung gleich.

Nur bei einzelnen Stämmen verminderte sich die Toxizität nach Trypsinbehandlung geringgradig.

Vergleichende Untersuchungen der Erdstämme aus Tiergehegen in denen sich Zootiere befunden hatten, aus deren Organen Cl. perfringens isoliert werden konnte, mit Erdproben aus Gehegen, in denen solche Tiere nicht gehalten waren, ferner mit Erdproben aus einem Gelände eines öffentlichen Parkes ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Toxizität der Kulturfiltrate.

Vor allem trat nicht hervor, daß Stämme aus Gehegen mit Tieren, aus denen später Cl. perfringens isoliert wurde, besonders toxisch waren.

Auch ließen sich in der Toxizität Unterschiede bei von der Erdoberfläche oder aus 10-20 cm oder 40-50 cm Tiefe gewonnenen Stämmen nicht feststellen.

Neutralisationsteste mit den Toxinfiltraten der 90 Perfringensstämme mittels Mäuselatalitätstest führten bei Verwendung eines Typ A-Antiserums zu dem Ergebnis, daß es sich bei allen 90 Stämmen um den Typ A handelte. Denn bei allen Stämmen wurde die doppelte oder einfache Dlm durch das Typ A -Antiserum neutralisiert im Gegensatz zu den mit physiologischer Kochsalzlösung vermischten Toxinfiltraten, die alle Mäuse töteten.

Zur Kontrolle der zuverlässigen Anzeigekraft des verwendeten A-Antiserums wurden vorhandene Standardstämme der Typen A, B und D dem Neutralisationstest in gleicher Weise unterworfen.

Dabei zeigte sich, daß das verwendete A-Antiserum nur die Toxinfiltrate der Standardstämme A₁ und A₂ neutralisierte. Die Stämme C und E mußten bei der Versuchsreihe aus technischen Gründen außer Betracht bleiben.

Da nach ZEISSLER (74) der Hitzeresistenztest zur Typerkennung insofern anwendbar ist, als der Typ F des Cl. perfringens durch seine Hitzeresistenz erkannt werden kann, wurde mit den 90 Stämmen auch dieser Test noch vorgenommen. Es zeigte sich, daß 26 Stämme schon eine fünf Minuten lange Erhitzung bei 100 °C nicht überstanden. Bei einer 1-stündigen Erhitzung waren alle 90 Stämme abgetötet. Diese Zeit wird nach ZEISSLER von dem Typ F in jedem Fall überstanden.

Um den Einfluß des für die Gewinnung der Toxinfiltrate benutzten Logan-Nährsubstrates und der Bebrütungsdauer festzustellen, wurde noch einmal versucht, in der gleichen Weise, wie es TZIMAS (69) mit den Standardstämmen A₁ und A₂ versucht hat, die Dlm von 50 Erdstämmen zu ermitteln.

Als Nährboden diente TZIMAS die Pope-Bouillon. Die Dauer der Bebrütung der beimpften Bouillon betrug 16 Stunden.

Von den 50 als Typ A diagnostizierten Erdstämmen zeigten 14 Stämme bei Verwendung der Toxinfiltratgewinnungsmethode von TZIMAS eine geringe Letalität von 0,1 - 0,4 ml (28%). 36 Stämme (72%) waren im Letalitätstest negativ.

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß das Logan-Substrat für die Toxingewinnung der Pope-Bouillon weit überlegen ist. Die Frage, inwieweit die Bebrütungszeit die Toxinausbeute beeinflusst, läßt sich nicht schlüssig beantworten. Es wird für möglich gehalten, daß je nach verwendetem Nährmedium die Bebrütungszeit unterschiedlich gehandhabt werden müssen. Was das Logan-Substrat anbetrifft, so ist klar, daß die Bebrütungszeit von 6 Stunden ein optimal toxisches Filtrat ergibt.

Die gleiche Zeit ist auch von ZEISSLER (74) und ARDAHALI (4) für die Verwendung des Robertamediums angegeben worden.

Nur in wenigen Fällen wurden bisher bei Zootieren Infektionen mit dem Typ A des *Cl. perfringens* nachgewiesen.

NOUVEL und RINJARD (zit. nach 47) berichteten beispielsweise, daß sie bei Seeelefanten eine Perfringensinfektion durch Typ A feststellen konnten, während PREVOT (48) diese Infektion bei einem Pinguin vorfand.

In vorliegender Arbeit gelang es bei einer weiblichen Giraffengazelle (*Litocranicus walleri*) und einem Säbelantilopenbock (*Oryx tao*) eine Perfringens-Infektion zu ermitteln.

Bei beiden Tieren gaben das klinische Bild und der Obduktionsbefund bestimmte Hinweise für diese Infektion. Bei zwei anderen Zootieren (Kuduantilope (*Tragelathus strepiceros*) und Giraffengazellenbock (*Litocranicus walleri*)) war der Nachweis einer *Cl. perfringens*-Infektion nicht zuverlässig zu führen. Zwar ließen sich aus den Organen Keime des *Cl. perfringens* Typ A isolieren, aber es waren Zweifel vorhanden, ob diese Keime nicht postmortal in die Organe eingedrungen waren, und der klinische und pathologisch-anatomische Befund sprach bei diesen Tieren nicht eindeutig für diese Infektion.

Die Tatsache, daß in allen 85 Erdproben *Cl. perfringens* Typ A festgestellt wurde und dieser Nachweis auch in der Erde von Flächen geführt werden konnte, auf denen keine Tiere gehalten wurden, läßt den Schluß zu, daß das *Cl. perfringens* Typ A sehr oft in der Erde nachweisbar ist.

Der Nachweis des gleichen Types in einer Weizenprobe bei einer Untersuchung von insgesamt 10 Futterproben zeigt weiterhin, daß der A-Typ auch im Futter vorkommen kann. Somit dürften für Zootiere Möglichkeiten bestehen, diesen Erreger peroral aufzunehmen. Da aber der Typ A auch im Darmkanal gesunder Tiere (4, 58, 67) vorkommt, bleibt die Frage offen, wie es zu der Entstehung einer Enterotoxämie überhaupt kommt. Es dürfte wohl die Auffassung der Autoren zutreffen, die annehmen, daß bestimmte Stressfaktoren, die namentlich die Funktion des Magens und des Darmes beeinträchtigen, auslösend für die Entstehung einer Enterotoxämie wirken.

E. Zusammenfassung =====

Bei einer weiblichen Giraffengazelle (*Litocranicus walleri*) und einer Säbelantilope (*Oryx tao*), die unter dem Bild einer Enterotoxämie gestorben waren, wurde eine Infektion mit Typ A des *Cl. perfringens* festgestellt. Bei einer Kuduantilope (*Tragelathus strepsiceros*) und einem Giraffengazellenbock (*Litocranicus walleri*) wurde ebenfalls in den Organen der Typ A von *Cl. perfringens* ermittelt. Bei diesen Tieren fehlten klinisch und pathologisch-anatomisch jedoch Anzeichen für eine Enterotoxämie, so daß diese nicht sicher diagnostiziert werden konnte.

In 85 Erdproben, die aus Gehegen von Zootieren und einem öffentlichen Park gewonnen worden waren, wurde in jedem Fall der Typ A des *Cl. perfringens* ermittelt. Der gleiche Typ konnte in einer Weizenprobe bei Untersuchung von 10 Futtermittelarten gefunden werden.

Für die perorale Aufnahme dieser Keimart durch Tiere bestehen bei dem ubiquitären Vorkommen des Types A günstige Möglichkeiten. Diese Tatsache erklärt aber nicht allein die Entstehung der Enterotoxämien, da der Typ A auch bei gesunden Tieren im Darmkanal vorkommt. Es gilt daher die von Kennern der Anaerobeninfektion der Tiere vertretene Auffassung, daß Streßfaktoren, die die Darmfunktion beeinträchtigen, auslösend für die Entstehung einer Enterotoxämie wirken dürften.

F Literaturverzeichnis

=====

- 1) Akama, K.,
S. Otans u.
S. Kameyama
Studies on clostridium perfringens
in the faeces from healthy human
Jap. J. Bact. 21, 645 (1966)
Ref.in: Excerpta medl, Amsterdam,
Sect. IV, 21, 362 (1968)
- 2) Altemeier, W.A.
Bacteriology of traumatic wounds
J. Amer. Med. Ass. 124, 413 (1944)
- 3) Ambrosioni, P.
Spora una particolare derivazione
del Bacillus perfringens nelle
aque
Annuario Soc. ital. igiene 48,
461 (1938)
- 4) Ardahali, M.
Some observations on clostridium
perfringens strains isolated in
Iran
Bull.Off.int.Epiz. 67, 1207 (1967)
- 5) Arlan, G.,
M.P.H. Helstad,
D. Adrian,
S. Alfred u.
M.P.H. Evans
Thermostable clostridium perfrin-
gens as a cause of food poisoning
outbreak
Publ.Health Rep. (Wash.) 82,
157 (1967)
- 6) Beer J.,
G.Al-Khatib u.
H. Pilz
Enterotoxämie der Kälber durch Cl.
perfringens Typ B
Mhefte Vet.med. 23, 18 (1968)
- 7) Boulay, P. u.
G. Bouley
A propos de vingt cas de toxi-in-
fection alimentaire canine a
Welchia perfringens A dans une
meute
Recueil.méd.vet. Paris 139,
223 (1963)
- 8) Bullen J.J. u.
I. Batty
Enterotoxamia of sheep
Vet.Rec. 69, 1268 (1957)
- 9) Cooke, W.T. u.
A.L.P. Peeney
Clostridial infections in war
wounds
Lancet 1, 487 (1945)
- 10) Cottureau, P.
Toxi-infections provoquées par des
aliments infectés par des germes
anaerobes notamment par Welchia
perfringens et Welchia agni
Bull.Off.int.Epiz. 67, (1967)

- 11) Cygan, Z. u. K. Wanzrhiewiczowa Clostridium perfringens de typ A dans les états inflammatoires du tractus digestif des animaux Bull.méd.vét. Lublin 22, (1966)
Ref.in: Bull.Off.int.Epiz. 67, 1331 (1967)
- 12) Dieckmann, C. Recovery of Cl. welchii type F from preserved cultures
Brit.Med.J. 1, 270 (1949)
- 13) Dische, F.E. u. S.D. Elek Experimental food-poising by Cl. welchii Lancet 237, 71 (1957)
Ref.in: Excerpta med.Amsterdam, Sect. IV, 11
- 14) Franke, F. Intrakutanteste mit Toxinfiltraten von Cl. welchii an immunisierten Meerschweinchen unter Berücksichtigung der Typendifferenzierung Vet.med.Diss.Berlin FU (1968)
- 15) Gins, H.A. u. U. Koeppen Beiträge zur bakteriologischen Diagnostik der Gasödemerkrankungen des Menschen
Zbl.Bakt.I.Orig. 150, 124 (1943)
- 16) Griner, I.A. Some factors influencing the incidence of enterotoxaemia in domestic animals
Bull.off.int.Epiz. 59, 1443 (1963)
- 17) Gurtürk, S. Die Typen des Cl. welchii; ihre Differenzierung und pathogene Bedeutung
Vet.med.Habil-Schrift Hannover (1952)
- 18) Hac, L.R. u. M.L. Eilert Experimental Clostridium welchii infection; oral sulfonamide therapy (Sulfanilamide-Sulfapyridin-Sulfathiazole and Sulfadiazine)
J.Infect.Dis. 72, 167 (1943)
- 19) Hall, H.E. u. R. Angelotti Cl. perfringens in meat and meat products Appl.Microbiol. 13, 352 (1965)
- 20) Hallmann, L. Bakteriologische Nährböden Thieme, Stuttgart (1953)
- 21) Hausschild, A.H.W. u. F.S. Thatcher Experimental food-poisoning with heat-susceptible Cl. perfringens type A
J. food.Sci. 32, 467 (1967)
- 22) Hinz, K.H. Studien über das Alpha-Toxin von Cl. welchii
Vet.med.Diss. Berlin FU (1964)

- 23) Hobbs, B.C. *Cl. welchii* as a food-poisoning organism
J.Appl.Bact. (London) 26, 74 (1963)
- 24) Hobbs, B.C.,
Muriel, E.,
C.L. Oakley,
G.H. Warrack u.
J.C. Cruickshank
Clostridium welchii food-poising
J.Hyg. (Cambridge) 51, 75 (1953)
- 25) Ivanov, I.,
D. Belcev u.
S. Berkov
Enterotoxaemie de la bufflesse et
de la vache en Bulgarie
Vet.sbirka, (Sofia) 60, 11 (1963)
Ref.in: Bull.Off.int.Epiz. 59,
1636 (1963)
- 26) Katison, R.V. Les toxi-infections causées par les
microbes anaerobies et l'importance de leur étude
Bull.Off.int.Epiz. 59, 1351 (1963)
- 27) Lesbouryies, G. u.
M. Berthelon
Enterotoxaemie du lapin
Bull.acad.vét. France 9, 74 (1936)
- 28) Logan, M.A.,
A.A. Tytell
I.S. Danielson u.
A.M. Griner
Production of *Cl. perfringens*
alpha toxin
J. Immunol. 51, 317 (1945)
- 29) Mac Farlane, R.G. u.
Mac Lennan, J.D. The toxæmia of gas-gangrene
Lancet 2, 328 (1945)
- 30) Mac Lennan, J.D. Anaerobic infections in Tripoli-
tania and Tunisia
Lancet 1, 204 (1945)
- 31) Mac Lennan, J.D. The role of clostridia in
diarrheal disease of man
Ann.N.Y. acad. Sci. 66, 162 (1956)
Ref. in: Excerpta med., Sect. IV,
10, 336 (1957)
- 32) Matthes, S. Untersuchungen über die Dermotoxine
der 6 *Clostridium-welchii*-Typen
am Kaninchen
Zbl.Bakt.I.Orig. 191, 508 (1965)
- 33) Mc Bee, R.H. Intestinal flora of some antarctic
birds and animals
J.Bact. 79, 311 (1960)
- 34) Mc. Ewen, A.D. u.
R.S. Roberts
Enteritis and peritonitis of sheep
caused by a bacterial toxin derived
from the alimentary canal
J. Comp. Path. 44, (1931)

- 35) Mc Gowan B., J.E. Moulton u. S.E. Rood Lamb losses associated with clostridium welchii type A
J.Amer.Vet.Med.Ass. 133, 219 (1958)
- 36) Meszaros, J., L. Pesti, B. Lomniezi u. S. Juharz Study of the role of Clostridia in swine gastroenteritis
Bull.Off. int.Epiz. 67, 1307,(1967)
- 37) Meyn, A., J. Bergmann u. E. Endrejat Über das Vorkommen schafpathogener Typen des Fraenkelschen Gasbacillus in Deutschland
Mhefte prakt. Tierheilk. 4, 259 (1952)
- 38) Miessner, H. u. Albrecht Gasödeme unserer Haustiere III. beim Pferd
Berl. tierärztl. Wschr. 32, 13 (1940)
- 39) Mitscherlich, E. u. E. Bratke Die Enterotoxämie der Schafe
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 67, 229 (1954)
- 40) Montgomery, R.F. "Strike" of sheep in North Wales
Vet.J. 91, 350 (1945)
- 41) Moraillon, P. u. N. Yalcin Contribution a l'Etude étiologique des welchioses animales
Bull.Off.int.Epiz. 67, 1329 (1967)
- 42) Nagler, F.P.O. Treatment of experimental gas gangrene due to Clostridium welchii with Penicillin and antitoxin
Brit.J.Exper.Path. 26, 57 (1945)
- 43) Oakley, C.L. u. H.G. Warrack Routine typing of Clostridium welchii
J.Hyg. 51, 202 (1953)
- 44) Otten, E. u. S. Henze Bakteriologische Untersuchungen an der Tonsilla palatina des Hundes
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 66, 186 (1953)
- 45) Prévot, A.R. u. M. Moureau Recherches sur les bacteriel. anaerobies de la terre Adelie prelevées par la première expedition antarctique française
Ann.Inst.Pasteur Paris, 83, 332 (1952)
- 46) Prévot, A.R. Etudes des anaerobies isolés des boues methanogènes
Ann.Inst.Pasteur Paris 73 , 222 (1947)
- 47) Prévot, A.R. Biologie des maladies dues aux anaerobes Flammarion, Paris (1955)

- 60) Sinell, H.J. u.
R. Levetzow Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Clostridien in Lebensmitteln
Arch.Lebensmittelhyg. 18, 73 (1967)
- 61) Smith, R.R. u.
N.R. Gartner The occurrence of vegetatives cells of Clostridium perfringens in the soil
J.Bact. 58, 327 (1949)
- 62) Stableforth, D.W. u.
J.A. Galloway Infectious disease of animals. Disease due to bacteria, Vol. I
Butterworths, London (1959)
- 63) Stamatin, N. u.
G. Ungureanu Epizootologie des clostridioses
Bull.Off.int.Epiz. 57, 1251 (1967)
- 64) Stephenson, D.u.
H.E. Ross Chemotherapy of Cl. welchii type A and Cl. septique infections in mice
Brit.Med.J. 1, 471 (1940)
- 65) Strong, D.H.,
J.C. Canada u.
B.B. Griffiths Incidence of Cl. perfringens in american foods
Appl.Microbiol. 11, 42 (1963)
- 66) Taylor, A.W. u.
W.S. Gordon A. survey the types of Cl. welchii present in soil and the intestinal contents of animals and man
J.Path.Bact. 50, 271 (1940)
- 67) Tobesch, K. Über das Vorkommen von Cl. welchii im Kot und Darm klinisch gesunder Schafe
Vet.med.Diss.Berlin FU (1966)
- 68) Tomov, T.,
J. Ivanov,
K. Surtmadjiev u.
M. Draganov Investigation into the spread of Clostridium perfringens types A, C and D
Veterinärmedizinische Aufsätze, Heft 10, Sofia 1965
- 69) Tzimas, P. Letalitätsprüfungen im Mäusetest mit den 6 Typen des Clostridium (Cl.) welchii unter Verwendung verschiedener flüssiger Nährmedien
Vet.med.Diss.Berlin FU (1964)
- 70) Wagner, K. Die Diagnose des Rauschbrandes
Vet.med.Diss.Hannover (1923)
- 71) Weipers, W.L. Clostridia in experimental intestinal obstruction and a study of the toxic substances present in the loop contents and peritoneal fluid
Bull.Off.int.Epiz. 59, 1419 (1963)

- 72) Weymouth, D.K., Report of Clostridium in capons
 M. Gersham u. Avian Dis. 7, 293 (1963)
 H.L. Chute
- 73) Willis, A.T. Anaerobic bacteriology in clinical
 medicine
 Butterworths, London (1960)
- 74) Zeissler, J., Die Gasödeme des Menschen Bd. I,
 C. Krauspe u. Steinkopff, Darmstadt (1958)
 L. Rassfeld-Stern-
 berg

Für die mir von allen Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Hygiene bei meinen Arbeiten gewährte und immer bereitwillig geleistete Unterstützung möchte ich mich herzlichst bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Hartwigk und Herrn Dr. F. Franke.

Herr Prof. Hartwigk überließ mir das Thema der Arbeit, gab mir vielfältige Anregungen und half mir bei der schriftlichen Abfassung dort, wo meine Deutschsprachkenntnisse nicht ausreichten.

Herr Dr. Franke übermittelte mir die bei der Differenzierung der Typen des *Cl. perfringens* erforderlichen technischen Kenntnisse und gab mir wertvolle Hinweise auf die Literatur und die Zusammenfassung der Ergebnisse in übersichtlichen Tabellen.

Herzliche Dankesworte möchte ich auch an Herrn Dr. H.-G. Klös, Direktor des Zoologischen Gartens Berlin, für die Überlassung des Materials, und an Herrn Dr. R. Göltenboth richten, der mir die klinischen Befundberichte bei den untersuchten vier Zootieren überließ.

Auch Herrn Prof. Dr. W. Renk und Herrn Dr. Dämmrich sei besonders gedankt für die Überlassung der Obduktionsbefunde und ihre korrekte Abfassung.

Lebenslauf

Am 1.11.1940 wurde ich, Habib Chenitir, als erstes Kind des Kaufmanns Salah Chenitir und seiner Ehefrau Aoicha, geborene el Gheriani, in Zaghouan/Tunesien geboren.

Von 1946 bis 1953 besuchte ich die Grundschule; anschließend bis 1957 die Vorbereitungsschule für das Gymnasium in Zaghouan.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich das Gymnasium "le lycée carnot de Tunis".

1960 bestand ich das Baccalauréat 1^{ere} Partie und im Juni 1961 das Baccalauréat 2^{ieme} Partie serie sciences expérimentales.

Nachdem ich im Goethe-Institut Berlin einen viermonatigen Deutsch-Lehrgang absolviert hatte, begann ich im Sommersemester 1962 mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin. Das Studium schloß ich mit dem tierärztlichen Staatsexamen 1967 ab.

Die Pflichtpraktikantenzeit leistete ich bei Herrn Dr. med. vet. R. Bismark in Twedt/Schleswig und am Zoologischen Garten Berlin ab.

